

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Studijní obor: Biologie



Pavčina Šámalová

Bakalářská práce

Vývoj mikroskopických technik a jejich vliv na zobrazování buněčných struktur

The development of microscopy techniques and their influence on the visualization of
cell structures

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Lucie Čermáková, Ph.D.

Praha, 2016

Poděkování

Děkuji neznámému vynálezci mikroskopu za otevření dveří do tohoto nádherného světa, všem, kteří mě s sebou vzali do laborky a více či méně mě nechali nakouknout pod mikro pokličku, své laskavé školitelce za velkou trpělivost a schovívavost a v neposlední řadě mým nejbližším, kteří mě podporovali.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 19. 8. 2016

Pavλίna Šámalová

Abstrakt

Cílem práce je literární rešerše na téma zobrazování objektů v rámci buněčné biologie pomocí mikroskopických technik (elektronová mikroskopie, konfokální mikroskopie). Práce stručně popíše vývoj mikroskopických technik ve 20. století a zaměří se na diskuze týkající se objektivitu zvolených technik a problematiky důvěryhodnosti a interpretace výsledů získaných tímto typem pozorování.

Klíčová slova

Mikroskopie, buněčná biologie, vizualizace ve vědě

Abstract

The aim of this thesis is to review the literature on the topic of the visualization of objects in the realm of cell biology by means of various microscopy techniques (electron microscopy, confocal microscopy, etc.). It will describe the development of microscopy techniques during the 20th century and focus on discussions dealing with the objectivity of selected techniques and the trustworthiness of results gained by this means of observation.

Key words

Microscopy, cell biology, visualisation in science

Obsah

Úvod	1
Mikroskopie	2
Vhled do mikroskopie s ohledem na pozorování biologických vzorků	4
Světelná mikroskopie a počátky pozorování buněk	4
Elektronová mikroskopie.....	5
Konfokální mikroskopie	7
Mikroskopie skenovací sondou	8
Skenovací tunelová mikroskopie (STM).....	8
Mikroskopie atomárních sil (AFM)	9
Akustická mikroskopie	11
Další mikroskopické metody	12
Přínos zobrazovacích technik pro buněčnou biologii ve 20. Století	13
Historie buněčné teorie	13
Pozorování jednotlivých organel	15
Diskuse	24
Závěr.....	28
Zdroje	29
Literární zdroje	29
Internetové zdroje	35

Úvod

Objekty malé stejně tak jako ty velké a vzdálené člověka odedávna fascinují a přitahují. Tak jak toužili naši předci hledět do dálek vesmíru na obrovská kosmická tělesa, zatoužili i po pohledu na věci, které byly jejich zraku skryty či ukrývaly podstatu předmětů, které je obklopovaly, ba dokonce podstatu jich samotných a možná že i podstatu života. Člověk se chtěl podívat na vše, krásně se to dá pozorovat i dnes- dejte dítěti mikroskop a uvidíte, co všechno pod něj vloží, aby to prozkoumalo. Když se na vzorky podíváte, téměř jistě bude většina z nich rostlinného či živočišného původu, nejinak tomu bylo v historii vědeckého i méně vědeckého bádání.

S rozvojem optiky se lidem začaly tajné mikrosvětla odhalovat a se zlepšováním optických soustav jsme se od lupy dostali až na samý kraj pozorovatelnosti, limitovaný vlastnostmi světla. A tu se otevírá pole pro metody jiné nežli optické, které dohlédnou na ještě menší objekty. Dohlédnou? Opravdu můžeme ještě mluvit o hledění?

Pozorování živých objektů vyžaduje i jiné podmínky než jen ty ideální pro optiku.

Potřebujeme zachovat vzorek ve stavu odpovídajícím realitě, tomu jak vypadá a jak se chová v běžném prostředí, což pozorování v případech všech metod komplikuje. Nicméně, jak můžeme vidět podle vývoje mikroskopických technik, je pro nás živý vzorek stále velice lákavý a nevyčerpaný a proto se mu metody přizpůsobují co nejvíce. Jsou však opravdu dostatečně šetrné? Kolik z výsledného obrázku v článku je realita a co práce v počítačových programech?

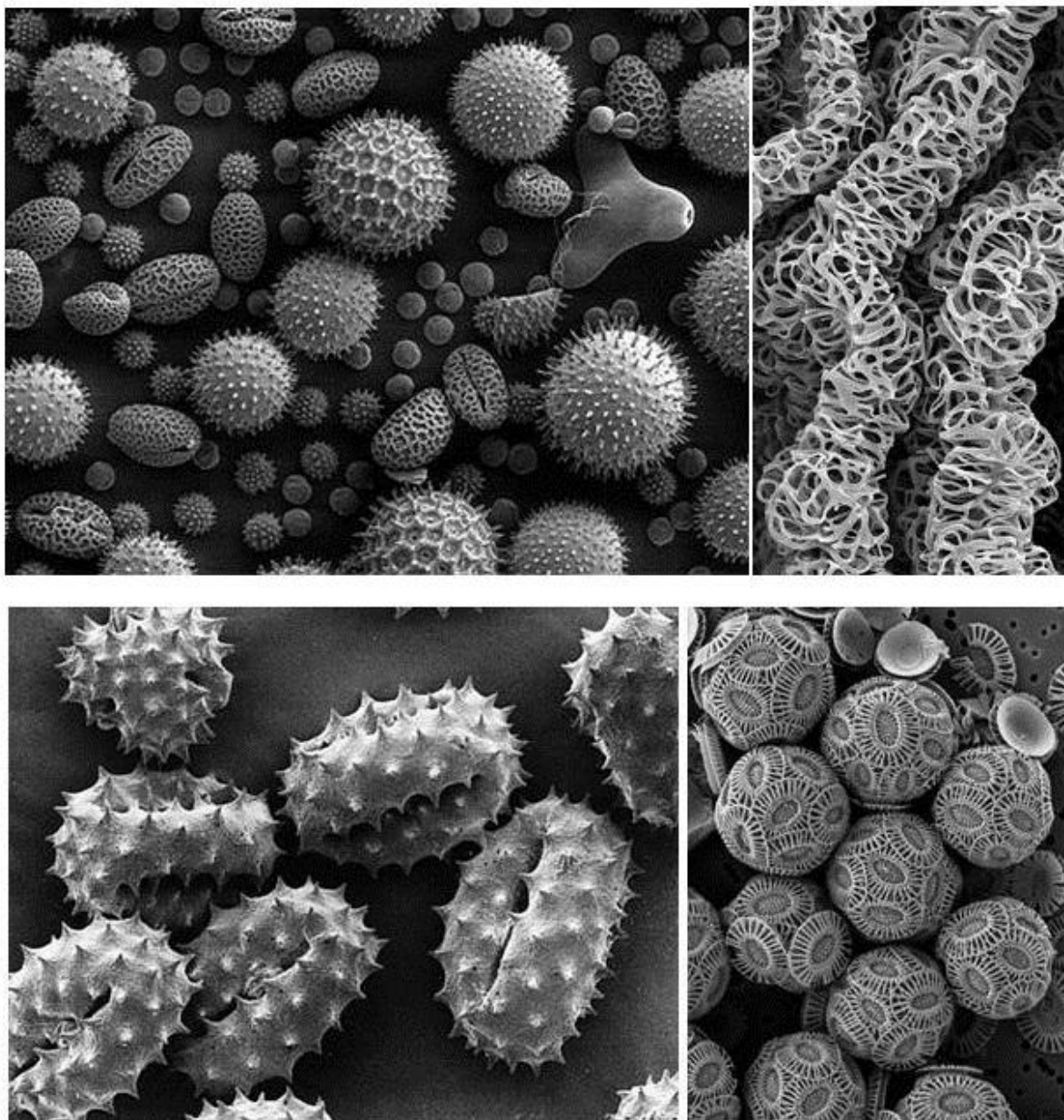
Tato práce by měla vést čtenáře k zamyšlení nad tím, co se skrývá za obrázkem publikovaným v odborném článku. V první kapitole se zaměřím na vybrané mikroskopické metody a jejich vývoj s ohledem na pozorování biologických vzorků. V kapitole druhé pak prozkoumám počátky buněčné teorie a přínos moderních zobrazovacích metod pro buněčnou biologii a biologii vůbec.

Mikroskopie

Samotné slovo mikroskopie pochází ze starořeckých slov mikrós označující něco malého a skopēō znamenající dívat se. Z toho nám vyplývá, že se mikroskopie dívá na malé objekty, případně my se pomocí mikroskopie díváme na malé objekty.

Pro fyzikální, ale hlavně biologický výzkum je mikroskopie v dnešní době naprosto nepostradatelnou součástí. Jen díky ní si můžeme ověřit hypotézy a téměř doslova se podívat, zda platí. Stejně jako můžeme náhodně odhalit něco, co je zajímavé, pak tuto oblast dále zkoumat a to povede k vývoji třeba i celých vědních odvětví. Ale mikroskopie již nesloží pouze k pozorování, ale pomocí některých metod původně určených k pozorování je možno vzorek ovlivňovat a modifikovat a následně zkoumat jeho změněné vlastnosti či schopnosti. Význam mikroskopie pro bádání na poli vědy je evidentní už jen z toho, že za vynálezy v oblasti nových mikroskopických metod byla roku 1986 udělena Nobelova cena za fyziku.

Poznatky získané mikroskopickým pozorováním jsou součástí výuky již v základním vzdělání. Stejně tak se se samotným optickým mikroskopem mohou žáci setkat poměrně brzy a sami pod ním pozorovat pobírané biologické struktury. Neměli bychom zapomenout ani na umělecký potenciál mikroskopie. Umění a mikroskopie mají společnou podstatu- zviditelňují neviditelné. Vědci si všímají krásy mikroskopických zobrazení a užívají těch nejhezčích k popularizaci a četný zájem o jejich dílo je opět důkazem toho, jak mikrosvět přitahuje naši pozornost.



Obr. 1. Zleva několik estetických snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu. Obrázky pocházejí z popularizačních stránek či encyklopedií, nicméně našla jsem je i jako součást soukromých blogů, což dokládá široký zájem o mikroskopicky získané snímky, nejen pro vědecké využití. Pyl https://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope#/media/File:Misc_pollen.jpg (28. 7. 2016), plíce http://seedmagazine.com/portfolio/22_library-of-lungs.html (28. 7. 2016), pyl <http://media.web.britannica.com/eb-media/10/109410-004-B2D57355.jpg> (28. 7. 2016) a kokolátky <https://www.flickr.com/photos/107387387@N06/10618754893/> (28 7. 2016)

Vhled do mikroskopie s ohledem na pozorování biologických vzorků

Metod pro pozorování mikroskopických objektů je v dnešní době poměrně mnoho, proto se zaměříme na ty nejčastěji využívané- světelnou mikroskopii, elektronovou mikroskopii, mikroskopii konfokální a mikroskopii skenovací sondou a také zmíníme akustickou mikroskopii, jež svou odlišnou metodou získávání obrazu náš výběr doplní.

Světelná mikroskopie a počátky pozorování buněk

Pozorování objektů mikrosvěta začalo právě díky světelné mikroskopii. Na přelomu šestnáctého a sedmnáctého století se ze znalosti optiky rodí mikroskop, není však zcela jasné, kdo byl jeho objevitelem a kdo ho ke svým pozorováním již využíval. Konec sedmnáctého století již prokazatelně patřil mikroskopii a přírodovědcům zvučných jmen jakými byli Leeuwenhoeck a Malphigi (Wilson, 1995; Singer, 1914; Singer, 1915). Dalo by se čekat, že za ta staletí výzkumu nemůžeme již nic nového objevit, nicméně i čistě optické soustavy je možné stále zdokonalovat a v dnešní době jsou využívány komplikovanější mikroskopy, fázový kontrast či polarizační mikroskopie a jiná vylepšení (Plášek, 1995). Zdrojem světla již není pouze Slunce a i podmínky, ve kterých lze vzorek při pozorování uchovávat se dnes stále více blíží přirozeným podmínkám.

K tomu, aby bylo vidět to, co není pro světelnou mikroskopii zobrazitelné, je možné použít fluorescenčních značení a pomocí laserů o určité energii vyvolávat fluorescenci o nižší energii u označených objektů. Některé organické látky, obvykle se zvýšeným obsahem aromatických aminokyselin, mají přirozenou autofluorescenci, již můžeme využít při pozorování buněk (Lakowicz, 2006) (viz obr. 2). Tím, že je při získávání signálu využito laserů, lze barvit jeden vzorek více fluorescenčními barvami najednou a více lasery o různých vlnových délkách vyvolávat jejich signály. Možnosti barvení jsou dvě, buď je vzorek obarven těsně před pozorováním flouoroforem¹ a nebo jsou naklonováni experimentální jedinci, kteří mají ve svém genomu přidánu sekvenci pro fluorescenční značku, která se posléze syntetizuje spolu s žádaným proteinem ve všech buňkách celého těla, kde se vyskytuje. První způsob je jednodušší a levnější, nicméně druhý by měl lépe zaručit, že výsledná fluorescence patří opravdu tomu proteinu, který má být pozorován a nedošlo k obarvení jiných struktur. Otázkou však je, zda prodloužení sekvence nemá vliv na funkci proteinu.

¹Látka schopná fluorescence, buď se sama váže na danou strukturu, či je asociována s látkou, jež se na onu strukturu váže, případně je využíváno značených protilátek, které se na strukturu váží. (Murphy, 2013)

Také zde číhá nebezpečí nadměrného či dlouhodobého osvětlení živých buněk laserem, to



Obr. 2. Blizna s pylem, vlastní fluorescence. Převzato z <https://www.prirodovedci.cz/storage/images/410x/4415.jpg> (28. 7. 2016).

může vyvolat artefakty a následnou smrt buňky, což umožňuje využití v nádorové terapii, ale v případě mikroskopie je nežádoucí. Pokud je snímání ukončeno dříve, než dojde k markantnímu poškození buňky, případně je-li poškození v důsledku užití například inhibitorů v experimentu očekáváno, může dojít k mylné interpretaci poškození způsobeného laserem. Přemíra nasvícení také způsobuje vysvěcování flouoroforů tzv. photobleaching (Murphy, 2013, str. 228- 230), jenž může mít za následek špatnou interpretaci slabšího signálu či jeho postupné úplné vymizení. Je tedy třeba dodržovat doporučenou intenzitu laseru a v případě, že pozorování potrvá déle, rozložit jednotlivá snímání po delších časových úsecích. Výzkum v této oblasti přichází s metodami, jež se snaží tyto nežádoucí efekty eliminovat (Ji, 2008; Bernas, 2004).

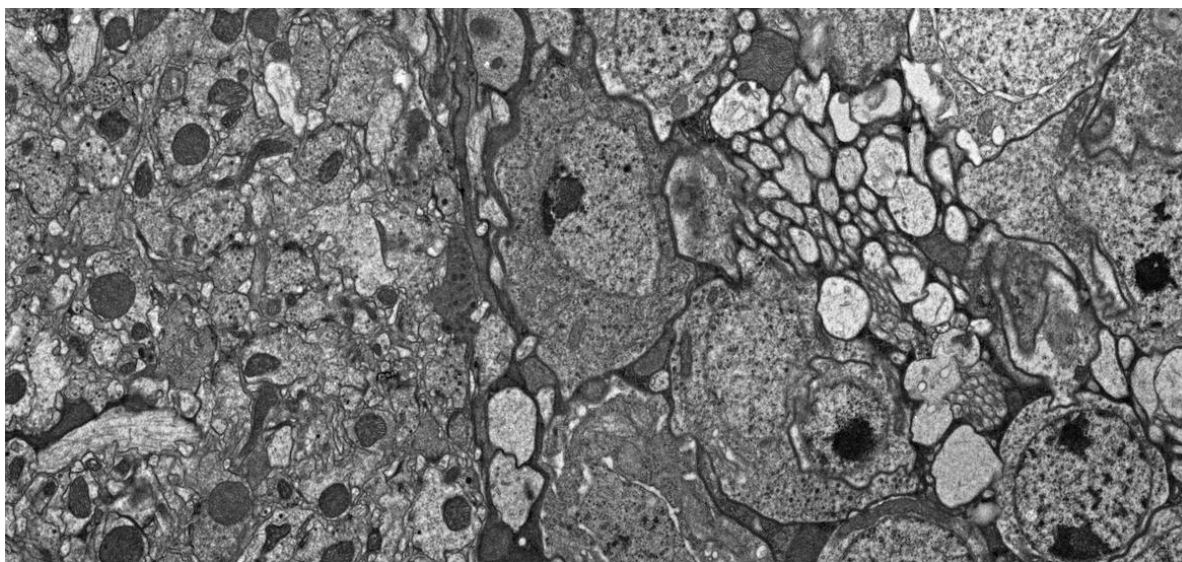
Elektronová mikroskopie

Po pozorováních, ke kterým byla využívána čistě optika, přichází elektronová mikroskopie, která již nevyužívá světlo ani lidské oko coby čidlo. Obraz je získáván pomocí detekovaných elektronů procházejících vzorkem (transmisní elektronový mikroskop) nebo pomocí zaznamenaných elektronů odštěpujících se ze vzorku (John J. Bozzola, 1998). Lidskému oku je soubor takto získaných dat předkládán ve formě černobílého obrazu.

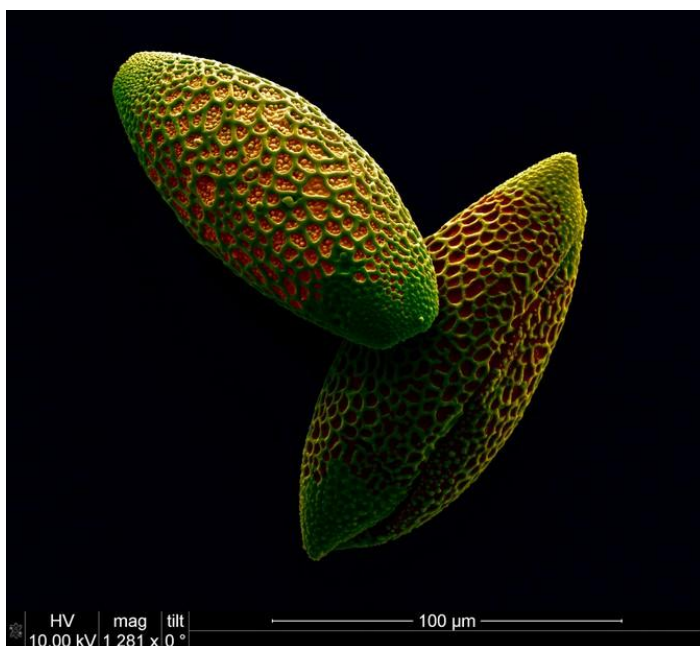
První sestavení elektronového mikroskopu Ernstem Ruskou na počátku třicátých let dvacátého století se zvětšením 12 000 otevírá nové možnosti v pozorování objektů (Haguenau, 2003). Pro biologické vzorky je tato metoda zobrazování využívána od čtyřicátých let dvacátého století. Nicméně buňky vypěstované na rovném povrchu, selekce co nejtenčích buněk, různá fixace buněk a následné vysoušení oxidem fosforečným (Porter, 1945) není nejšetrnějším způsobem, jak zachovat buňky ve stavu odpovídajícím buňkám v těle, na což také sami autoři upozorňují. Fixace buněk byla dále zkoumána a za nejlepší fixativum pro elektronovou mikroskopii byl označen oxid osmičelý (Palade, 1952a). Ten se používá dodnes pro své kontrastovací vlastnosti, avšak především v kombinaci s aldehydovou

fixací, jelikož pravděpodobně v reakci s ethanolem způsobuje densní precipitáty² (Nebesářová, 2001).

Dále je možné vzorek zmrazit- tato metoda je rozvíjena od roku 1946, kdy byla poprvé použita Ralphem Wyckoffem (Wyckoff, 1946). Že se mrazem dá nejen sušit, ale i lámat a využívat toho k pozorování buněčných membrán poprvé publikoval David Branton v druhé půli šedesátých let (Branton, 1966).



Obr. 3. Mozek mouchy zobrazený transmisí elektronovou mikroskopií (1200x zvětšený) Převzato z: https://microscopy.stanford.edu/sites/default/files/fly_brain_1200x_small.png (14. 8. 2016)



Obr. 4. Kolorovaný snímek pylu ze skenovacího elektronového mikroskopu. Převzato z

https://www.fei.com/uploadedImages/FEISite/Content/Image_Gallery/Images/IM_20100301_Hagen_4_Lilium_Pollen_lg.jpg (28. 7. 2016)

Ale i přes všechny ne příliš šetrné přípravy vzorku vděčíme právě transmisí elektronové mikroskopií za zřetelné obrázky složení cytoplazmy, které do té doby pomocí světelné mikroskopie nebylo možné získat

² Husté sraženiny

(Serpente, 2011) (více viz podkapitola Přínos zobrazovacích technik 20. století).

Čím byla transmisní elektronová mikroskopie pro odhalování buněčných organel a jejich stavby, tím byla (a stále je) rastrovací elektronová mikroskopie pro zkoumání povrchových struktur, (viz obr. 4). Tato metoda je esteticky/umělecky nejvděčnější, jelikož poskytuje obrázky mnohých známých objektů v neznámém, ale oku stále blízkém zvětšení a zároveň zde narážíme na mnohé rozmanité symetrie, ostré kontrasty a posloupnosti, které v černobílém kontrastním obraze působí velmi vzhledně (viz obr. 1). Obrazy se také počítačově dobarvují, ať už pro vědecké účely, tak mnohdy právě pro ty estetické (viz obr. 4).

Konfokální mikroskopie

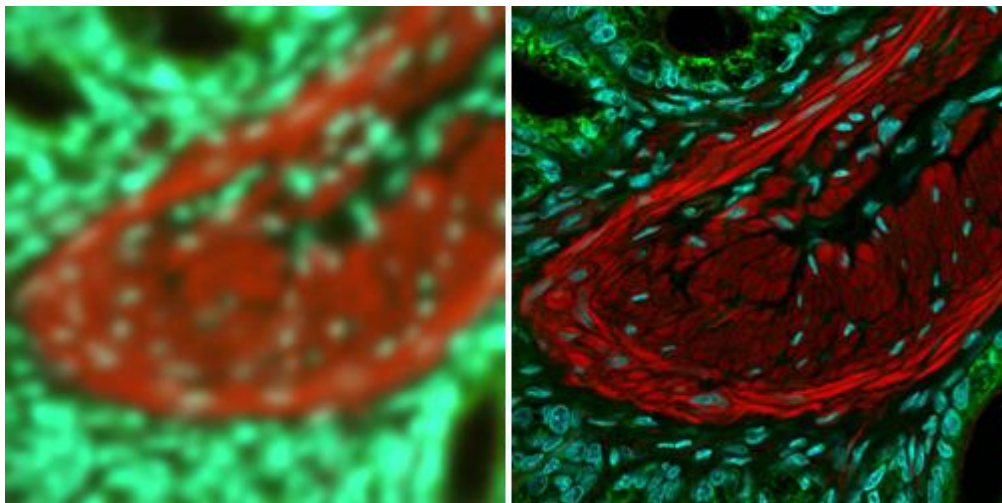
Koncept konfokálního mikroskopu pochází od Marwina Minskeho z padesátých let dvacátého století. První konfokální mikroskop fungující na principu Nipkowova kotouče³ sestrojil Mojmir Petráň z Lékařské fakulty v Plzni v tehdejším Československu (Egger, 1967). Dnes se však využívá hlavně technologie s konfokální clonou. Mikroskopem prochází světelný signál od vzorku, ale díky konfokální cloně projde k záznamovému zařízení jen jeho malá část, jež je přesně zaostřena díky vzájemnému postavení ohniska čočky a konfokální clony (Földes-Papp, 2003).

Tato metoda pozorování vzorků vychází ze světelné mikroskopie, ale díky pokrokům v technice je možné docílit velmi tenké hladiny ostroty. Pozorovaný objekt můžeme opticky nařezat na více řezů a vytvořit si tak prostorovou představu o jednotlivých částech ve vzorku. Možnost pozorovat buňky v živném médiu ve stavu co nejvíce se blížícím přirozeným podmínkám je velkou předností této metody.

Dostáváme se již do oblasti, kde nemůžeme plně využít potenciál optického mikroskopu bez počítačového zpracování dat. Lze si totiž také počítačově složit trojrozměrný obraz vzorku. Nejčastěji se konfokální mikroskopie používá v kombinaci s fluorescenčními metodami, využívá nejen fluorescence získané obarvením, ale také přirozené autofluorescence. Díky kombinaci s konfokálním mikroskopem je totiž možno odfiltrovat signál z okolních vrstev, či na druhou stranu signály z více optických řezů sčítat a dostat tak do jednoho obrázku např. všechny zobrazované částice bez ohledu na umístění v ose z, (Matsumoto, 2003) (viz obr. 5).

³ Otáčející se kotouč pokrytý spirálami desítek až stovek tisíc otvorů- clonek, přičemž každá z nich má unikátní vzdálenost od středu (Shotton, 1993, str. 292- 293)

Díky tomu, že je pozorovaný obvykle fluorescenčně barvený objekt nasvícován laserem jen do konkrétního malého bodu, je vzorek intenzivním světlem méně poškozován a fluorescenční barvy se nevysvěčují zbytečně v oblastech, které právě nejsou snímány. Vzorek tedy může být, při vhodném rozdělení skenovacích událostí, sledován v čase delší dobu bez artefaktů způsobených světelným poškozením.



Obr. 5. Řez 20µm tlustým střevem. Vlevo je obrázek z fluorescenčního mikroskopu a na pravé straně je zřejmý rozdíl, který je docílen použitím konfokálního mikroskopu. Díky zaostření do konkrétní tenké hladiny ostrosti neproniká do obrazu rušivý signál z hladin nad a pod zaostřenou oblastí, díky čemuž je obraz ostrý a jednotlivé části jsou jasně rozpoznatelné. Převzato z

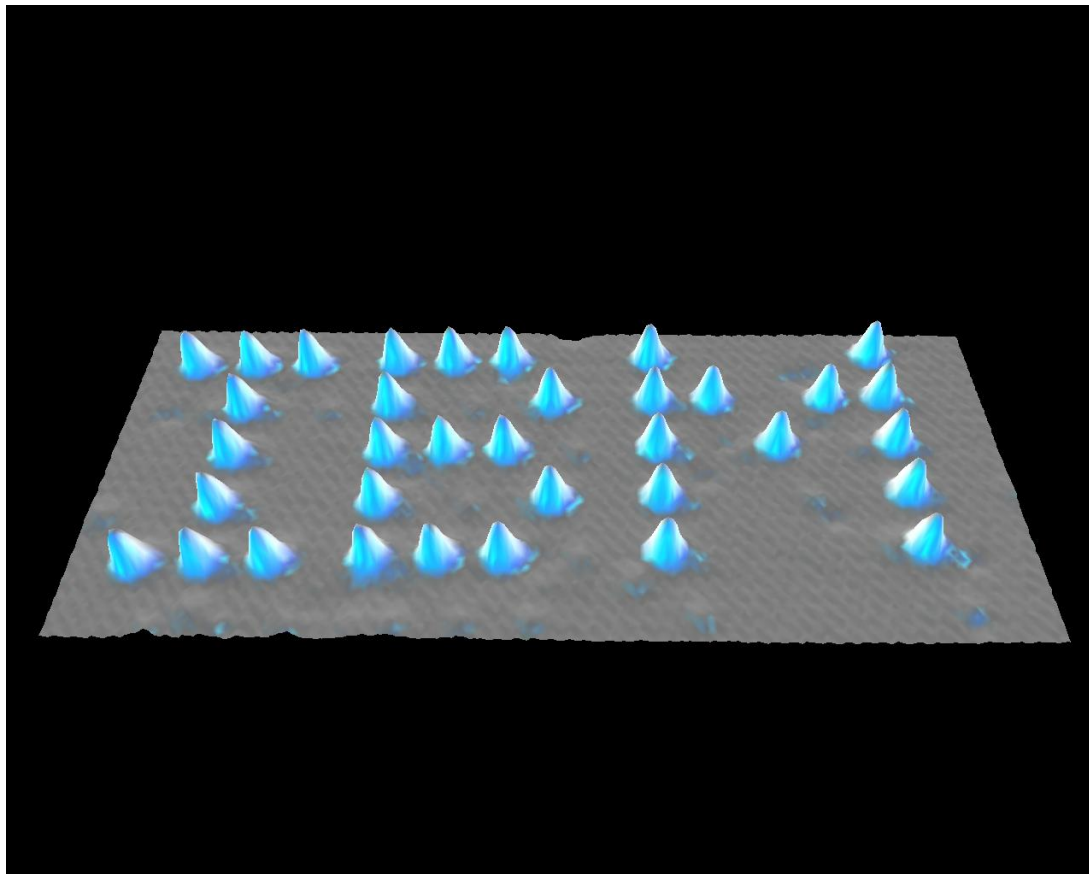
http://uacc.arizona.edu/sites/default/files/confocal_comparison.png (4. 8. 2016)

Mikroskopie skenovací sondou

Skenovací tunelová mikroskopie (STM)

Skenovací tunelovou mikroskopii vynalezli začátkem osmdesátých let dvacátého století Gred Binnig a Heinrich Rohrer (Binnig, 1982a; Binnig, 1982b; Binnig, 1983), kteří za tento přínos vědě spoluzískali roku 1986 Nobelovu cenu na fyziku. Ve vakuové komoře je umístěn vodivý vzorek, k němuž je skrz podklad přiváděn proud. Ze vzorku na hrot o velikosti jednoho atomu, jenž se pohybuje nad povrchem vzorku, „přeskakují“ elektrony, díky přiváděnému proudu. Tento jev se nazývá tunelování, odtud tedy slovo tunelová v názvu tohoto druhu mikroskopie. Přístroj skýtá dvě možnosti nastavení, jedním z nich je režim konstantní výšky hrotu nad povrchem a zároveň s tím i napětí, při kterém se mění hodnoty proudu. Druhý je režim konstantního proudu, při němž se mění výška hrotu nad povrchem vzorku a napětí a proud je udržován na jedné hodnotě. (Chen, 2008)

Pomocí této metody je možné nejen zaznamenávat povrch, ale také jednotlivé atomy přemísťovat (viz obr. 6), v poslední době mezi veřejnost prošla informace o možnosti zapisování dat formou jednotlivých atomů chlóru, k čemuž výzkumný tým využil právě skenovací tunelovou mikroskopii (Erwin, 2016).



Obr. 6. Logo IBM, vytvořené z atomů xenonu na niklovém podkladu je ikonicky spjaté s využitím STM pro manipulaci s jednotlivými atomy. Převzato z <http://researcher.watson.ibm.com/researcher/files/us-flinte/stm10.jpg> (16. 8. 2016)

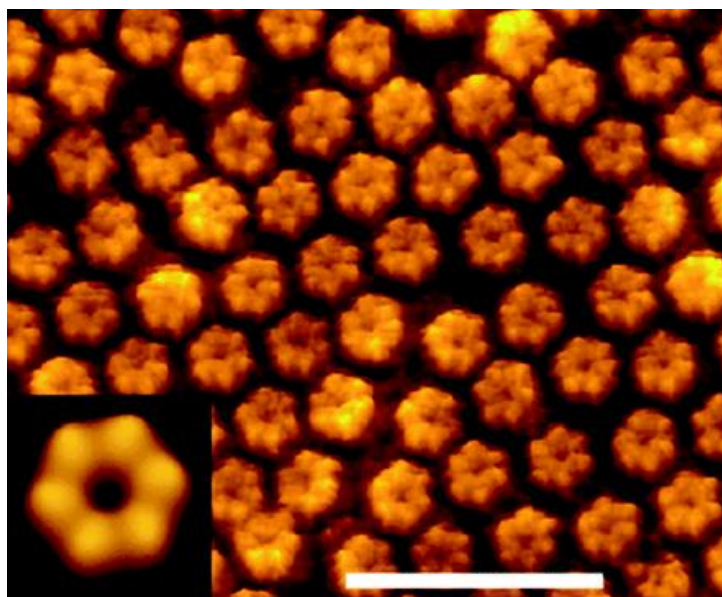
Mikroskopie atomárních sil (AFM)

V polovině osmdesátých let dvacátého století byl vyvinut šetrnější způsob pozorování povrchů na atomární úrovni, jež využívá meziatomových interakcí namísto dodávaného proudu, v případě skenovací tunelové mikroskopie. S touto metodou přichází opět Gred Binnig, spoluautor předchozí mikroskopické technologie (Bining, 1986).

Díky hrotu s velice ostrou špičkou- stejně jako v případě STM je to jediný atom či jedna molekula, je tento druh mikroskopu schopen zobrazit detaily povrchu na atomární úrovni a rovněž je možno jej využít pro přesouvání jednotlivých atomů. Využívá interakcí mezi

vzorkem a hrotem a díky zaznamenávání odrazu laserového paprsku od raménka, na němž se hrot nachází je možno sledovat pohyby raménka v detekovatelném rozlišení. Přístroj může mít různá nastavení. Při kontaktním nastavení se hrot dotýká přímo vzorku, což je sice nejsnazší varianta, nicméně může dojít jak k poškození hrotu, tak k poškození zkoumaného vzorku. Proto se nabízí možnost bezkontaktní, při které hrot jede nad povrchem vzorku a díky Van der Waalsovým silám sonda jemně interaguje se vzorkem a nemělo by tedy docházet k mechanickému poškození a oscilace raménka jsou opět detekovány. Posledním nastavením je poklepová varianta, při té je vzorek hrotem bez dotyku „otukáván“. Je vhodný pro neinvazivní zmapování povrchů, zároveň umožňuje uchopovat jednotlivé atomy a jejich přemísťováním vytvářet povrchy s různými možnostmi využití, tím už se ale od biologického využití odchylujeme zpět k technickému (Alonso, 2003; Tamayo, 1996).

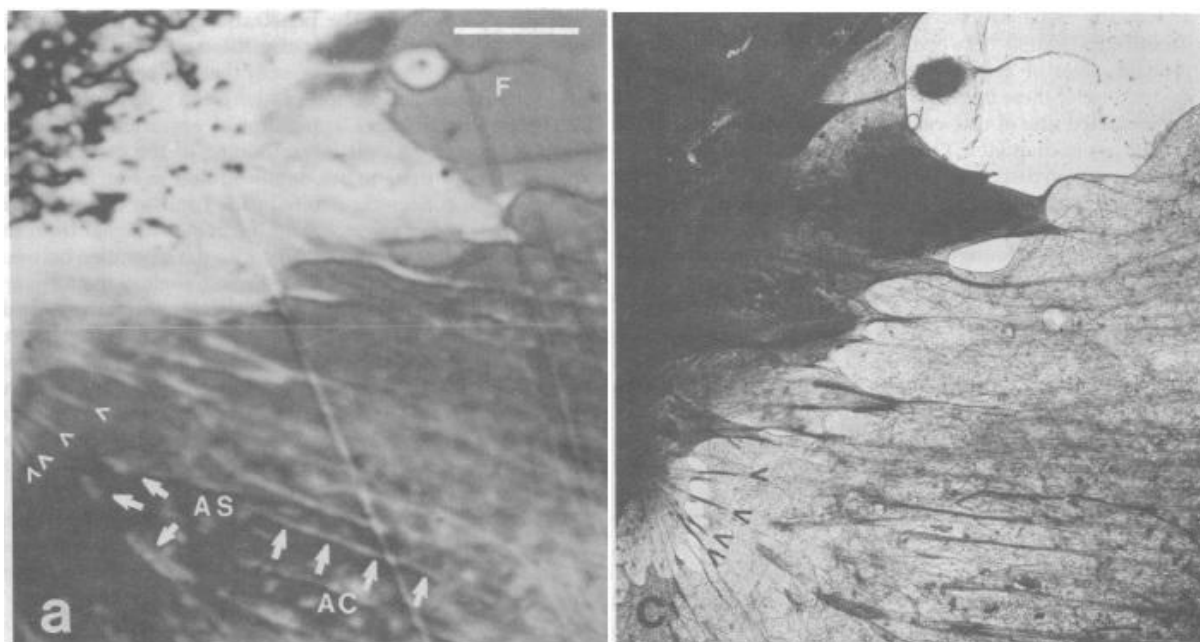
Tato metoda byla stejně jako mnohé jiné nejdříve využívána pro nebiologické vzorky, jelikož ty živé vyžadují specifické podmínky, mají-li být pozorovány s co možná nejmenším ovlivněním materiálu. Živý vzorek vyžaduje umístění do živného média, což klade na technické řešení přístroje vyšší nároky, jelikož primárně skenoval povrchy ve vakuu.



Obr. 7. Konexony zobrazené pomocí mikroskopie atomárních sil při laterálním rozlišení přibližně 1,2 nm. Upraveno podle Shan, 2015

Akustická mikroskopie

Myšlenka mikroskopického zobrazování pomocí zvukových vln dochází ze třicátých let vacátého století, nicméně až v roce 1959 vychází první práce představující akustický mikroskop (Dunn, 1959), většího rozvoje se však dočkala až od sedmdesátých let. Ve srovnání s elektronovou mikroskopií (viz obr. 8) přináší akustická mikroskopie možnost



Obr. 8. Vlevo (a) buněčná interakce zobrazena pomocí akustického mikroskopu, aktinová vlákna (AC), filopodium (F), přichycení k substrátu (AS) a vpravo (c) tatáž oblast zchycena transmisním elektronovým mikroskopem. Upraveno podle Johnston, 1979

pozorovat buňky živé bez fixace a umožňuje nám vidět určitý vývoj v čase, jelikož buňku výrazně nepoškozuje (Hildebrant, 1981). Kolimovaný svazek⁴ ultrazvukových vln je zaostřován konkávní safírovou čočkou a z ní přechází přímo do vodního prostředí, kde je v Mylarové membráně umístěn vzorek, skrz nějž prostupuje vlnění dále k další čočce, jež je k první zrcadlově obrácena (Lemons, 1975) nebo je ihned za vzorkem umístěna odrazová plocha, od níž se vlnění odrazí a prochází zpět toutéž čočkou, kterou ke vzorku přišlo (Johnston, 1979). Díky tomu, že se ohnisko obou čoček nachází v tomtéž bodě, je docíleno umocnění efektivního rozlišení. Signál, který takto prošel vzorkem je následně přeměněn na elektromagnetické vlnění a to posléze vytváří obraz na katodovém displeji. Zvětšení obrazu je poměrně jednoduché, jelikož závisí na nastavení napětí, které vychýlí paprsek elektronů před dopadem na displej. Oproti optickému mikroskopu zvukové vlny v akustickém mikroskopu zobrazují elasticitu vzorku, kdežto světelné vlnění dielektrické vlastnosti vzorku, akustický mikroskop je také citlivý na změny viskozity (Lemons, 1975).

⁴ Svazek, v němž všechny vlny prostupují stejným směrem.

Další mikroskopické metody

Metod vyvinutých pro zobrazování a využívaných v buněčné a molekulární biologii je více, avšak výše zmíněné techniky jsou reprezentativním vzorkem nejčastěji využívaných možností na nejrůznějších bázích. Mezi další metody patří, a rozhodně ji nesmíme opomenout, rentgenová mikroskopie vznikající již na počátku dvacátého století, ta je nyní hojně využívána v mnoha odvětvích (Kirz, 2009). Ramanova mikroskopie je kombinací zobrazování a získávání informace o složení vzorku a stále se vyvíjí (Freudiger, 2008).

Vývoj se nezastavuje ani v našem století, nejen, že se zdokonalují již používané metody, ale zavádějí se do výzkumu nové. Neutronová mikroskopie (Herrmann, 1985) je zatím stále předmětem vývoje, kdežto mikroskopie heliových iontů (Ward, 2006) je již pro výzkumníky dostupná v komerční oblasti (http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/multiple-ion-beam/orion-nanofab-for-materials.html, 15. 8. 2016), takže mikroskopii i nadále čeká pestrá budoucnost.

Přínos zobrazovacích technik pro buněčnou biologii ve 20. Století

Historie buněčné teorie

První, komu je připisován popis buňky, je Robert Hooke, jenž roku 1665 ve své práci *Micrographia* popisoval řezy korkem skládajícím se z malých jednotek. Jednotky nazval *cells* podle latinského označení *cella* pro malou místnost a *cellulae* pro buňku v plástvi ve včelím úlu. Autor se ovšem domníval, že tyto buňky slouží k proudění tekutin rostlinou. Pozorování prvních mikroskopických objektů, která prováděli Leeuwenhoek a Hook, jsou sice prvními záznamy o buňkách, nicméně nejsou zašitěny žádnou teorií, k tomu dochází až zpětně po formulaci buněčné teorie. (V následujícím výkladu o historii buněčné teorie se opírám především o práce Bentivoglio, 1999; Bentivoglio, 1998a; Bentivoglio, 1998b; Mazzarello, 1999; Serpente, 2011.)

V osmnáctém století přišel Lazzaro Spallanzani s myšlenkou, že organismy pocházejí vždy zase jen z organismů, činí tak jasné rozhraní mezi živou a neživou hmotou. Nad počátkem devatenáctého století se tedy vznášela otázka: „Co je tou nejmenší jednotkou splňující předpoklady života?“

Roku 1838 Matthias Jakob Schleiden zveřejňuje, že všechny rostlinné části jsou složeny z buněk, případně jejich produktů, těsně po něm Theodor Schwann publikoval obdobnou práci týkající se živočichů. Buněčná teorie je na světě. Schleiden se však domníval, že nová buňka se formuje coby cytotblast, jakási zvětšující se část buňky.

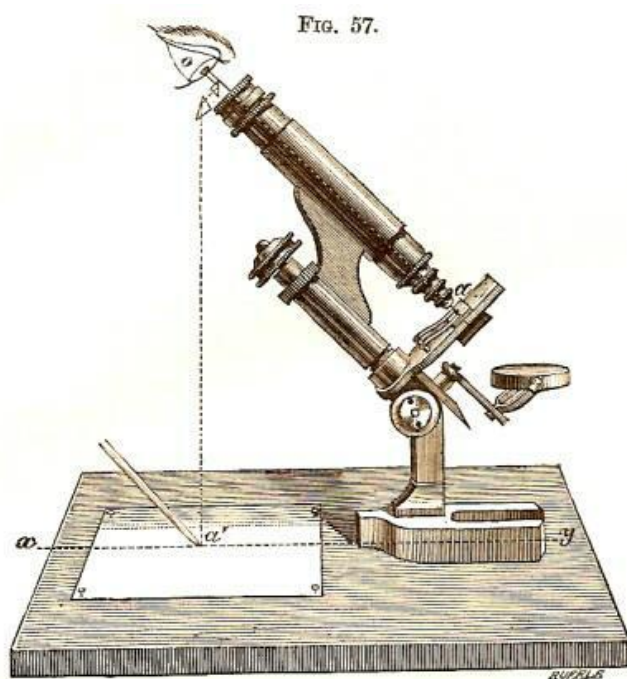
V padesátých letech Rudolf Virchow, Robert Remak a Albert Kölliker přišli s hypotézou, že buňka vzniká dělením již existující buňky. Základem teorie vzniku tkání se tedy stává Virchowův výrok *omnis cellula e cellula*. Nicméně Virchow neviděl buňku jen jako základ života, ale také jako základ nemoci, bez ohledu na původce nemoci se podle něj totiž jednalo o změny buněk v organismu.

V buňce tedy rozlišovali jádro a cytoplasmu, dříve nazývanou jako protoplasma. Ani jedna z částí buňky se však nejevila homogenně. Na struktuře cytoplasmy se však již neshodli, díky různým metodám fixace a barvení se totiž částice v cytoplasmě srážely do různých tvarů a jeden tudíž viděl váčky a druhý zase vlákna či další tvary. V případě buňky rostlinné bylo

relativně snadné pozorovat chloroplasty, jelikož obsahují chlorofyl a jsou tedy dobře rozpoznatelné, nejspíš právě proto již roku 1860 Julius von Sachs přichází s tím, že chlorofyl je lokalizován v tělískách, která mohou růst a dělit se. Název chloroplast pro tuto organelu zavádí roku 1885 Andreas Franz Wilhelm Schimper, který zároveň v chloroplastech rozpoznává grana a stroma (Meinder, 1985).

Díky zlepšení pozorovacích metod, ať už šlo o jinou fixaci a barvení, používání imerzních olejů či užívání mikrotomu se podmínky změnily, což vedlo k objevům uzavírajícím devatenácté století. Těžce barvitelný obsah jádra Walter Flemming nazval chromatin a též pozoroval dělicí se chromozomy. Pozorování endoplasmatického retikula roku 1897 bylo o rok později následováno objevy Camilla Golgiho: mitochondrie a Golgiho aparátu.

Až do začátku využívání fotografie pro zachycení mikroskopických vzorků bylo pro dosažení co největší přesnosti využíváno camery lucidy, což je zařízení obsahující hranol, které se umísťovalo na okulár. Pohledem přes hranu hranolu pozorovatel viděl objekt jak v okuláru, tak na papíře, na nějž vzorek zakresloval (viz obr. 9).



Obr. 9. Princip využití camery lucidy pro mikroskopii. Převzato z <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/imgaug08/A7.jpg> (17. 8. 2016)

Pozorování jednotlivých organel

Chloroplast byl z organel, které budu uvádět, pozorován nejdříve a to včetně vnitřní struktury, již byli schopni pozorovat v polovině osmdesátých let devatenáctého století (Meinder, 1985).

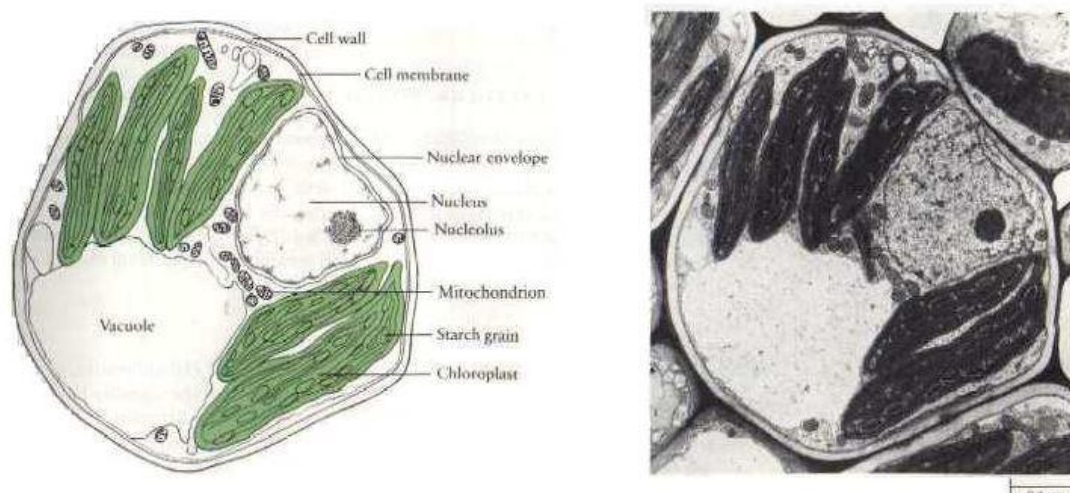
Snímání provedená transmisním elektronovým mikroskopem (viz obr. 10 a 11) následně potvrzují pozorování světelným mikroskopem.

Ve čtyřicátých letech, kdy se u jiných organel dohadovalo, zda vůbec existují, již autoři uvádějí, že grana jednoho chloroplastu jsou stejného průměru, ale grana dvou odlišných chloroplastů mohou mít průměry různé (Granick, 1947). V první polovině padesátých let se již práce zbývají ontogenezí či tím, že chloroplasty v temnostních podmínkách zcela nezanikají (Leyon, 1954; Wolken, 1953).



Obr. 10: Elektronmikroskopický snímek části chloroplastu s jasně viditelnými škrobovými zrny (označeno šipkou). Zvětšeno 8500x, upravno podle Leyon, 1954

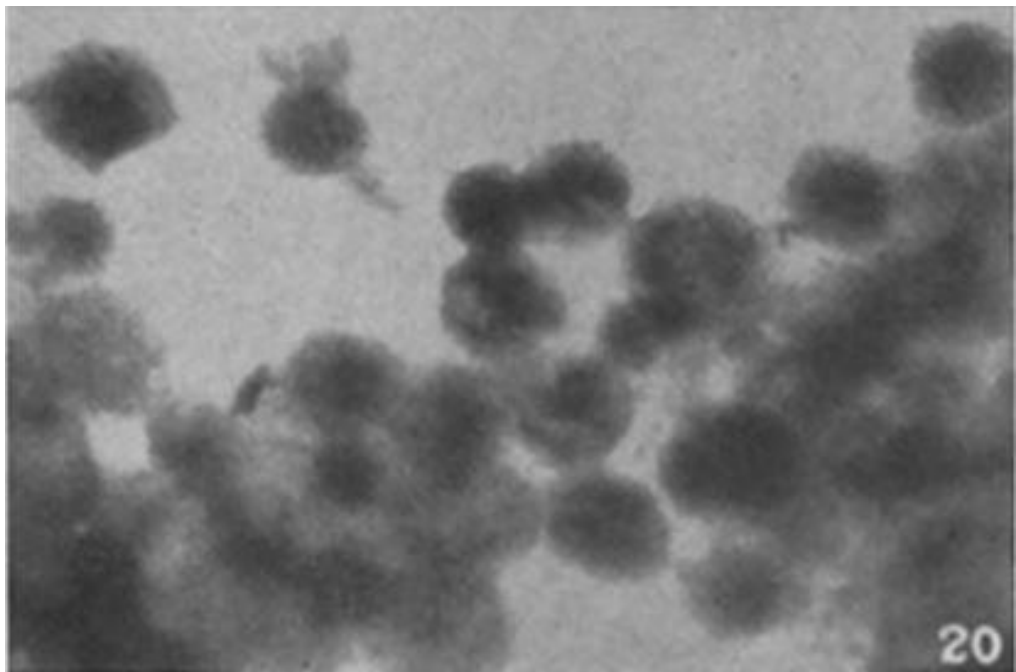
Od šedesátých let se oblíbeným tématem ve výzkumu chloroplastů stává jeho DNA. Nejprve bylo na řadě prokazování přítomnosti DNA v chloroplastech (Ris, 1962), následně přicházela na řadu otázka konformace a velikosti chloroplastového genomu (Kolodner, 1975) a posléze již odhalení kompletní sekvence chloroplastové DNA tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Shinozaki, 1986). Pro tyto práce již byly podstatné především metody molekulární biologie.



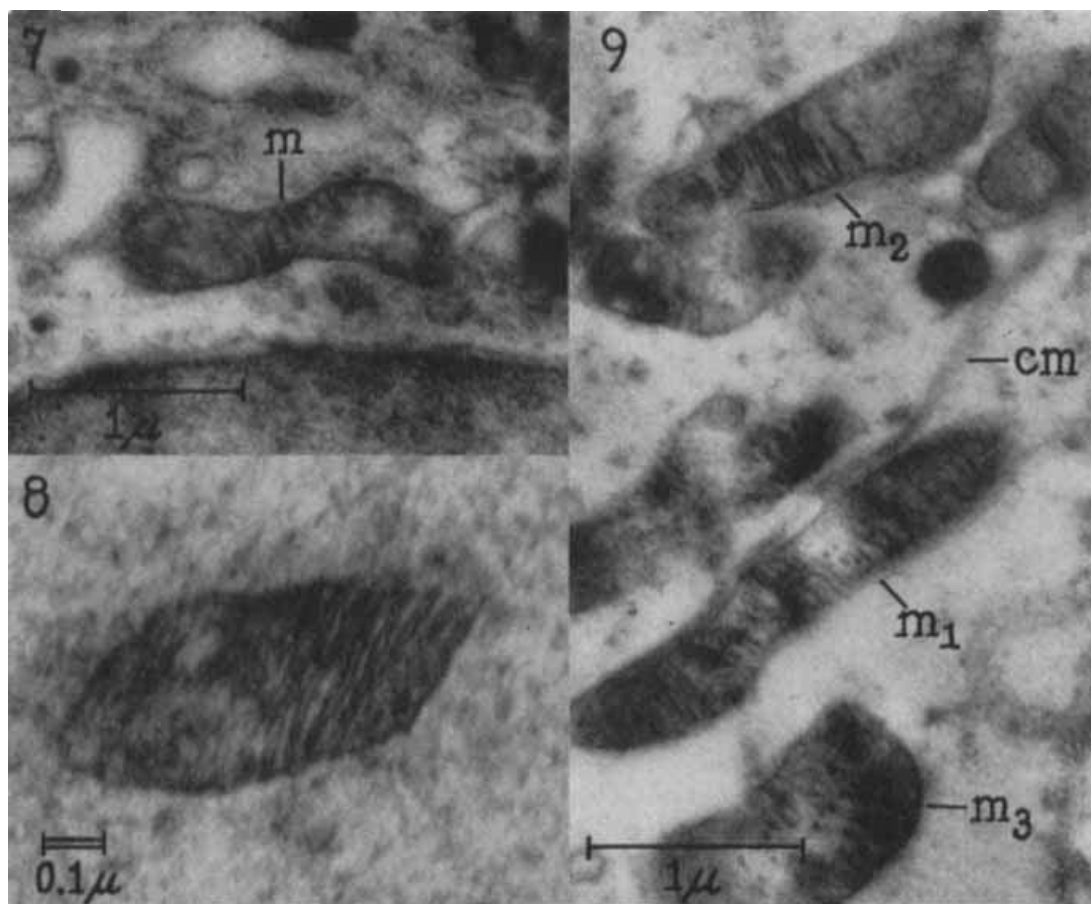
Obr. 11: Rostlinná buňka s chloroplasty- ukázka učebnicového zobrazení elektronmikroskopického snímku spolu s kresbou zachycující, co se na snímku z transmisního elektronového mikroskopu nachází. Převzato z Walsh, 1989

Podívejme se však na další organely, jejichž pozorování bylo oproti chloroplastům ztíženo jejich bezbarvostí, a proto byl vývoj sledování těchto součástí buňky poněkud opožděný. Albert Claude v polovině čtyřicátých let uvádí již tehdy známou rozmanitost tvarů mitochondrií v různých buňkách od granulárních tvarů po vláknitý vzhled, ale vnitřní struktura ještě nebyla pozorovatelná (viz obr. 12). S odvoláním na výzkum Roberta Chamberse z roku 1915, ale uvádí, že mitochondrie mohou vznikat *de novo* v protoplazmě, od čehož se odvíjí hypotéza Bungenberga de Jong, že se jedná o koacerváty⁵. Claude vkládá velké naděje do elektronového mikroskopu, jehož zvětšovací schopnosti slibují detailnější pohled nejen na mitochondrii. Ve své práci poznamenává, že je mitochondrie nejspíš obalena membránou, ale o tom zda se jedná o morfologickou jednotku, se neodvažuje rozhodovat (Claude, 1945).

⁵ Kapka organických sloučenin, v určitých hypotézách označována za možného předchůdce buňky a života na Zemi.



Obr. 12. Mitochondrie fixované oxidem osmičelým, zobrazené transmisním elektronovým mikroskopem. Zvětšeny 10 000x. Upraveno podle Claude, 1945

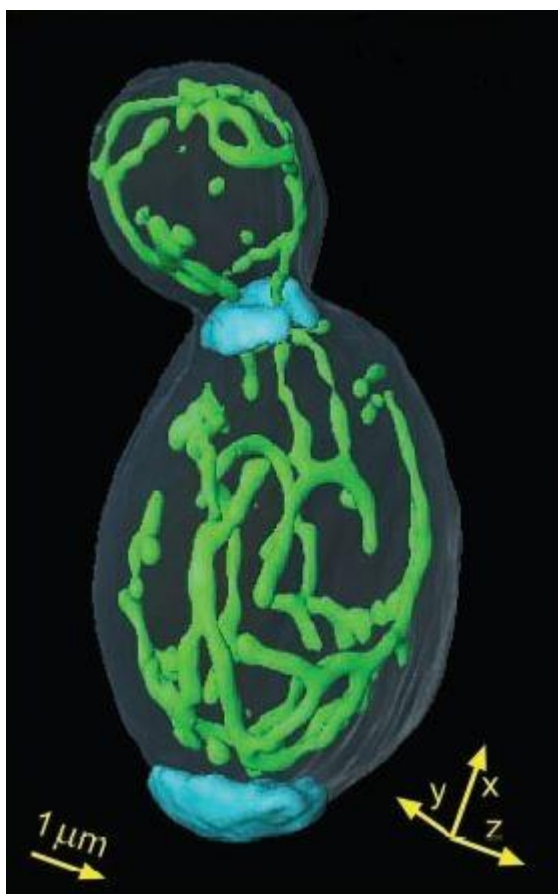


Obr. 13. Obrázky mitochondrií z přední hypofýzy laboratorní krysy pořízené transmisním elektronovým mikroskopem. Upraveno podle Palade, 1952b

Mitochondrii s její vnitřní strukturou poprvé elektronovým mikroskopem zobrazil George E. Palade (viz obr. 13) (Palade, 1952b), držitel Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství, již obdržel roku 1974 spolu s Albertem Claudem a Christianem de Duve, dalšími objeviteli na poli buněčné biologie. Harold Hillman upozorňuje na to, že mitochondrie zobrazené transmisním elektronovým mikroskopem mohou být dvourozměrné precipitáty či zobrazení organely, jejíž obsah precipituje při přípravě vzorku a tak vznikají domnělé membránové krysty (Hillman, 1977).

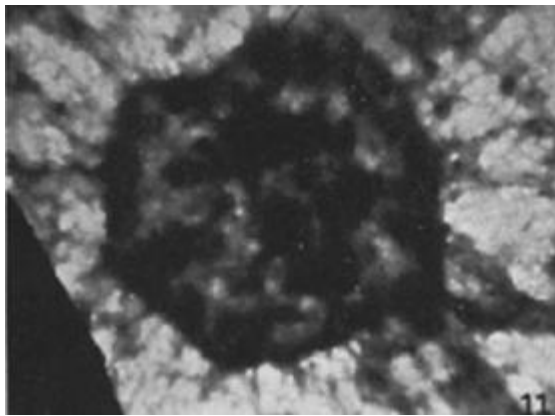
Ovšem výzkum mitochondrie šel dál a v sedmdesátých letech a později se výzkumníci ptali

mimo jiné po dějích odehrávajících se uvnitř organely (Wikstrom, 1977) a vlivu jaký má mitochondrie na náš organismus a délku života (Harman, 1972). Rovněž se zajímali o původ mitochondrie i chloroplastu (Schwartz, 1978), ale nezapomínali ani novými metodami v živých vzorcích ověřovat lokalizaci organel v rámci buňky (Johnston, 1980).



Obr. 14. *S. cerevisiae* s GFP¹ značenou mitochondriální matrix (zelená síť útvarů) zobrazená pomocí 4Pi konfokální mikroskopie. Upraveno podle Egner, 2002

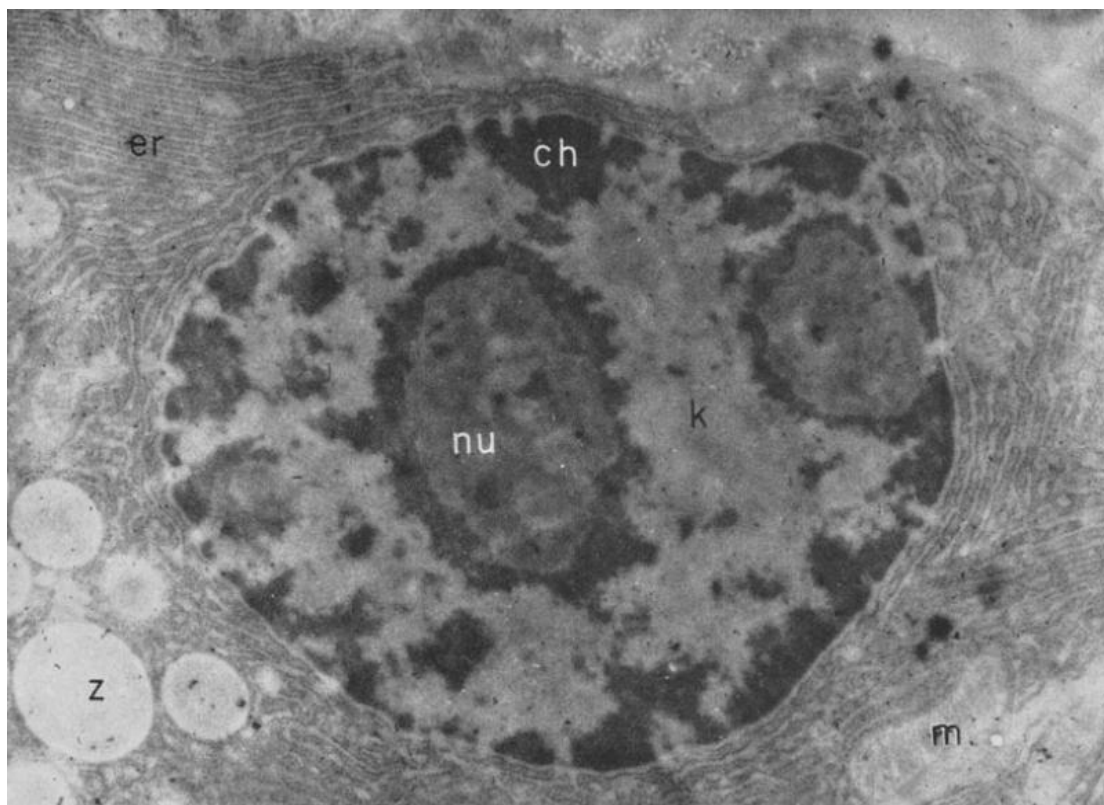
Pozorování živých buněk postupně ukázalo, že mitochondrie se ve zdravé buňce vyskytují v podobě proměnlivé sítě organel, kterou zobrazuje obrázek 14, který je o padesát let mladší než Paladeův. Tato síť se rozpadá na menší jednotky v případě, že dochází k apoptóze (Karbovski, 2003).



Obr. 15. Elektronmikroskopický snímek jádra buňky mezotelu. Zřetelně je vidět vakuolizaci po fixaci formalinem, autoři připisují tento jev vysušení. Zvětšeno 4100x. Upraveno podle Porter, 1945

Dostáváme se k jádru věci, respektive k jádru buňky. Zobrazovat jádro bylo, pro jeho tloušťku, pro transmisní elektronovou mikroskopii obtížné. Na elektronmikroskopických snímcích mělo jádro stejnou hustotu a tudíž i barvu, výjimku tvořilo jadérko, jež bylo rozpoznatelné. Pro lepší zobrazení jádra užili více druhů fixace, které však vedly u buňky ke scvrkávání cytoplazmy a granulaci v jádře (viz obr. 15) (Porter, 1945).

Jak je patrné z obrázku 16 (který má větší zvětšení), za téměř dvacet let se zobrazování jádra elektronovou mikroskopií zlepšilo a značně se již podobá dnešním snímkům.



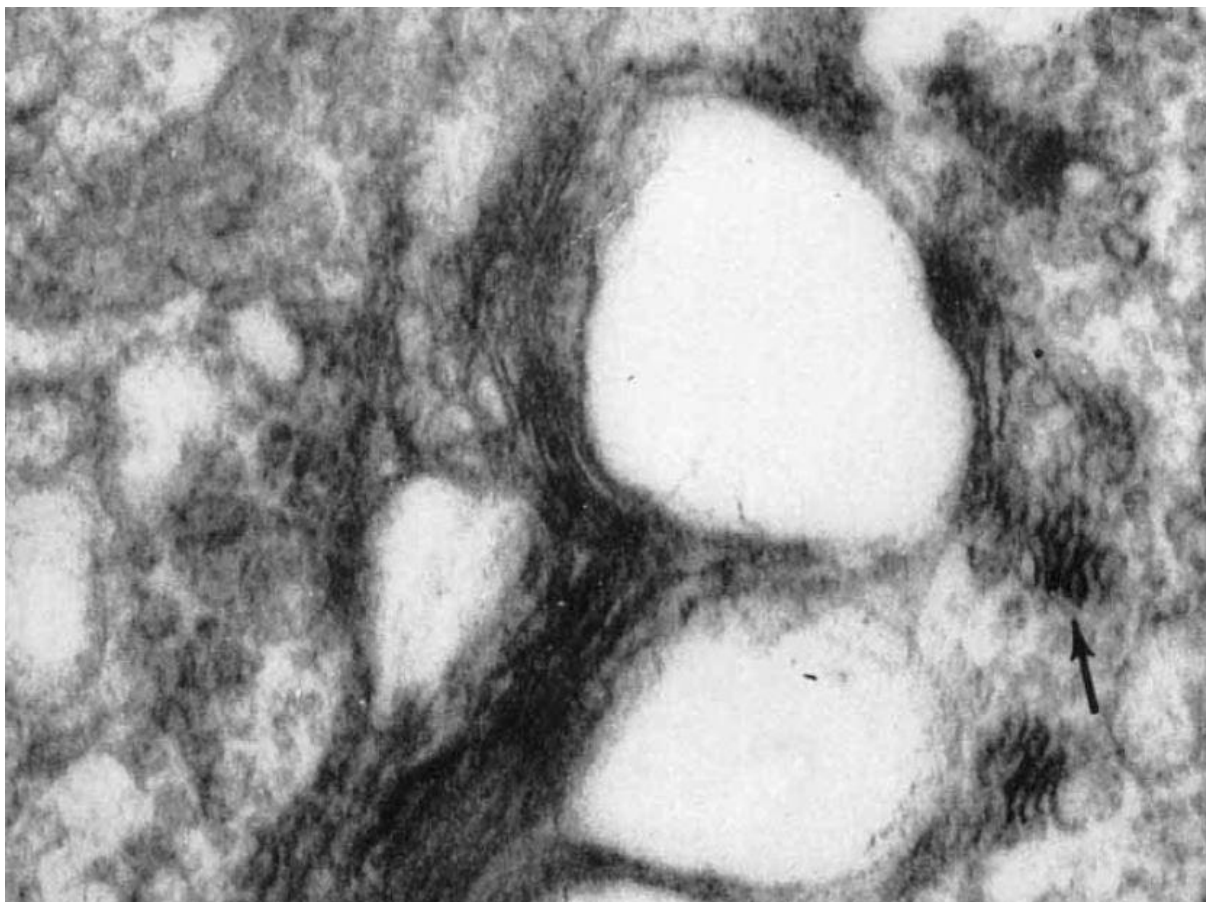
Obr. 16: Elektronmikroskopický snímek buňky slinivky fixovaný glutaraldehydem. Jádru v centrální části obrázku je zřetelně heterogenní. Ch- chromatin, nu- jadérko, k- karyoplasma, m- mitochondrie, er- endoplazmatické retikulum, z- proenzymové granule. Zvětšeno 11 000x. Převzato z Sabatini, 1963.

Hillman se se svým skeptickým pohledem zaměřil i na jádro, konkrétněji na póry a jadernou membránu (existenci jádra nezpochybňuje). Pochybuje o existenci jaderných pórů, jelikož bývají zobrazeny jen z frontálního a laterálního pohledu, žádný přechodný stav nebývá

zachycen. V případě jaderné membrány (stejně tak i cytoplazmatické membrány) se domnívá, že její dvouřadý vzhled je způsoben solemi uloženými na povrchu membrány (Hillman, 1977).

V případě jádra se dále pozornost hojně obracela k chromatinu, k jeho komplikované struktuře (Vogelstein, 1980) i k informaci, která je nesena v DNA, způsobu její replikace a vztahu s buněčným cyklem (Hand, 1978).

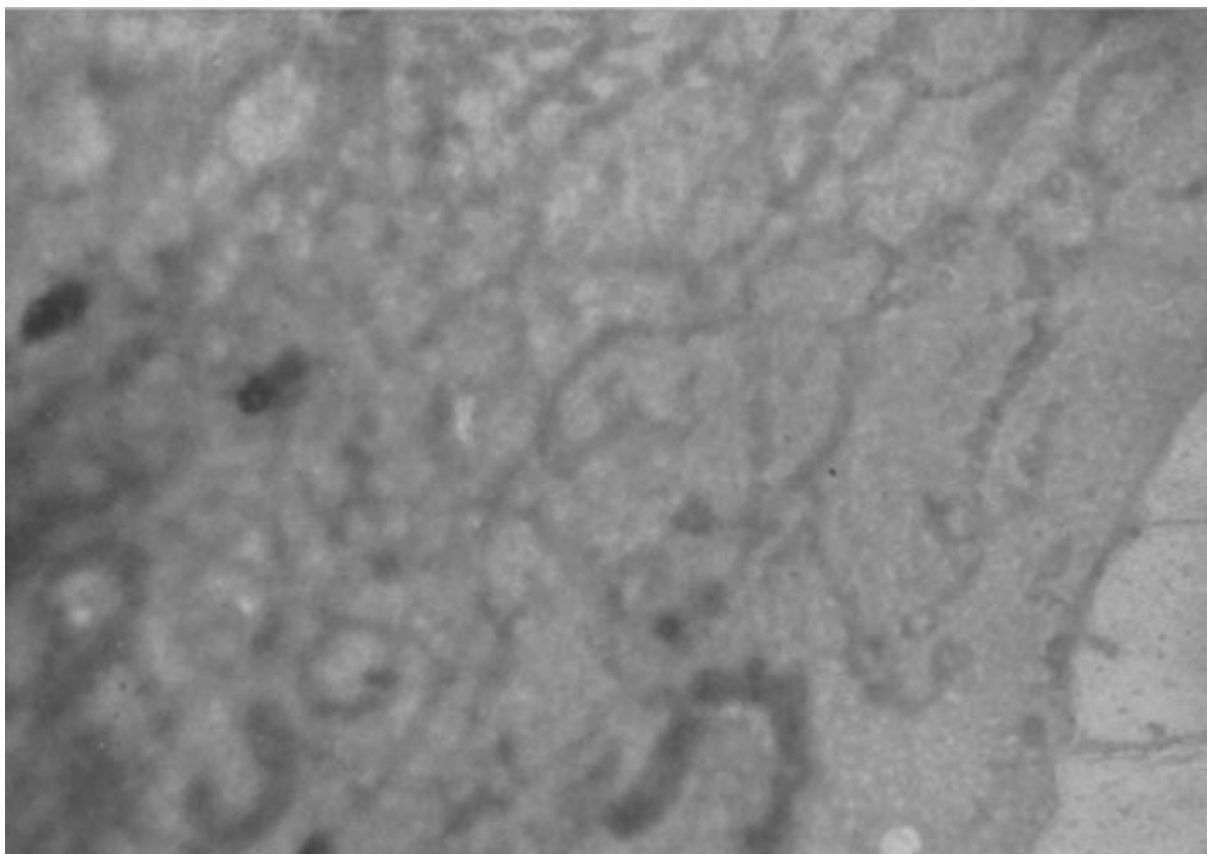
Dále zaměříme svou pozornost na dvě membránové organely. První organelou je Golgiho aparát, který byl popsán již v devatenáctém století, ještě na konci čtyřicátých let dvacátého století jsme se ale mohli setkat se skupinou výzkumníků, kteří měli za to, že se jedná o artefakt, vzniklý přípravou vzorku. Ať už se jednalo o myšlenku kontaminace myelinovými pochvami (Palade, 1949) nebo o obavu z akumulace kovových částic přidávaných při přípravě vzorku, ještě roku 1949 byli mezi tehdejšími vědci odpůrci existence Golgiho aparátu, velkým zastáncem myšlenky artefaktů byl John R. Baker (Bentivoglio, 1998a). V padesátých letech však více prací za pomoci elektronového mikroskopu hypotézu s artefakty vyvrací (Dalton, 1951).



Obr. 17. Snímek Golgiho aparátu (šipka) myší epiteliální buňky z transmisního elektronového mikroskopu. Zvětšeno 57 000x. Upraveno podle Dalton, 1954

Golgiho aparát byl dále zkoumán hlavně ve spojitosti s nervovou tkání a do hledáčku výzkumníků padalo taktéž sekretorické propojení s endoplasmatickým retikulem (Jamieson, 1967). A právě pro tuto organelu jsem si nechala na závěr této kapitoly.

Ač bylo endoplazmatické retikulum pozorováno již v devatenáctém století světelnou mikroskopií, za definici této organely vdčíme až týmu kolem K. R. Portera, který jej pozoroval za užití elektronové mikroskopie (Porter, 1945). Organelu popisují jako krajkovou síť, která se jeví jako poskládaná z řetězu váčků (viz obr. 18). Až o několik let později se tato struktura na návrh K. R. Portera začíná označovat coby endoplazmatické retikulum.

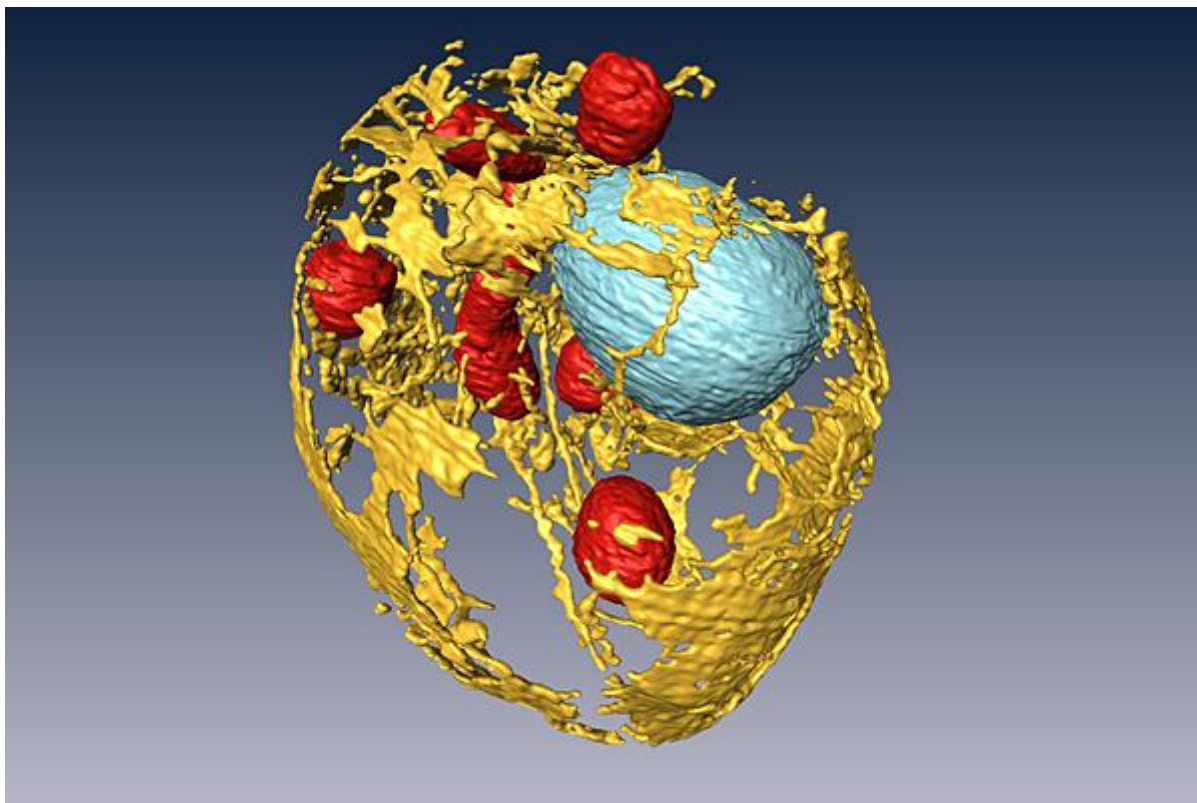


Obr. 18: První zobrazení endoplazmatického retikula transmisí elektronovou mikroskopií. Zvětšení:10 000x. Upraveno podle Porter, 1945

Rozmístění endoplazmatického retikula v buňce bylo ze snímků Sabatiniho skupiny v šedesátých letech evidentní, avšak při větším přiblížení (zvětšení 65 000x) se ukázalo, že obrysy jsou viditelné díky ribonukleoproteinům a vlastní membrána retikula zobrazena není (Sabatini, 1963).

O existenci endoplazmatického retikula Hillman pochybuje asi nejvíce. Argumentuje tím, že pokud se jedná o trojrozměrnou strukturu, měla by být zobrazována i z jiných pohledů, než z toho, z něž působí jako vláknité útvary. Proti tvrzení, že autoři článků publikují obrázky s dobře zobrazeným retikulem, protestuje. Toto by mělo platit jen v případě zobrazení menší části buňky, ne však u snímku buňky celé. Dalším sporným bodem pro něj je to, že pokud je retikulum trojrozměrné, muselo by znemožňovat proudění cytoplazmy rostlinných buněk či endocytózu a exocytózu pro svůj kontakt s cytoplazmatickou membránou. Jeho současníci se kloní k názoru, že endoplazmatické retikulum je nutné vnímat jako velmi dynamickou síť, což umožňuje výše zmíněné děje v buňce skloubit s existencí trojrozměrného retikula. Hillman endoplazmatické retikulum považuje za artefakt způsobený přípravou vzorku pro elektronovou mikroskopii, jednalo by se podle něj buď o precipitát cytoplazmy či led způsobený prudkým zmražením (Hillman, 1977).

Koncem šedesátých let se výzkumníci zaměřují na proteiny, jenž jsou produktem endoplazmatického retikula (Arias, 1969), taktéž pátrají po osudech membrán endoplazmatického retikula (Dallner, 1966). Dnešní pohled na strukturu endoplazmatického retikula nám přibližuje obrázek 19.



Obr. 19. Snímek kvasinky pořízený v roce 2011 pomocí FIB¹ v kombinaci s transmisní elektronovou mikroskopií. Zobrazeny jsou struktury- žlutě- endoplazmatické retikulum, modře- jádro, červeně- mitochondrie. Převzato z http://www1.udel.edu/udaily/2012/oct/images/3D_yeast_cell_FIB.jpg (16.8.2016)

Po období rozkvětu elektronové mikroskopie ve čtyřicátých a padesátých letech dvacátého století se zájmy pozorovatelů rozebíhají ke stále specializovanějším výzkumům, jak nám dokládají publikace u jednotlivých organel z doby sedmdesátých let a později. Zároveň se do poznávání mikrosvěta zapojují nové mikroskopické i molekulární metody, díky nimž se daří rozkrývat taje organel, molekul a dokonce i jednotlivých atomů. Všechny tyto výzkumy v buněčné a posléze i molekulární biologii však stojí na základech daných světelnou a elektronovou mikroskopií.

Diskuse

Tato práce ukazuje, že elektronová mikroskopie sehrála významnou roli ve výzkumu buněčných organel. Ale až díky zdokonalování jak elektronové mikroskopie, tak i dalších snímacích metod a neustálému vývoji práce se vzorkem získáváme přesnější představu o buňce. Toto je třeba mít na paměti i u nově přichozích metod, které ještě procesem odhalování chyb a zdokonalováním neprocházejí tak dlouho a být k jejich datům zdravě kritičtí.

V diskusi se opírám především o tyto práce: *Objectivity* (Daston, 2007) a článku *Cells from icons to symbols: Molecularizing cell biology in the 1980s* (Serpente, 2011).

V biologii je zásadní pozorování živých objektů a tudíž vyvstávají otázky, které chemie či fyzika řešit nemusí. Pro některé metody se musí vzorek výrazně upravit, aby bylo možné jej danou metodou vůbec pozorovat (např. elektronová mikroskopie), což může způsobit artefakty významně zkreslující realitu živého vzorku. Tak tomu bylo v případě mitochondrie a až pozorováním dalšími metodami se zjistilo, že typická učebnicová mitochondrie je vlastně z velké části výsledkem úprav vzorku pro elektronovou mikroskopii.

K určité míře poškození může dojít samotným snímáním obrazu. Nadměrné či dlouhodobé osvětlení živých buněk laserem může vyvolat artefakty a následnou smrt buňky. Využití kontaktního nastavení mikroskopu atomárních sil může vzorek poškodit hned po prvním snímání.

Harold Hillman, který kritizoval pozorování některých buněčných struktur a označoval je za artefakty způsobené přípravou vzorku, se mohl mýlit. Nicméně autoři jako je on zpochybňováním přijímaných dat udržují výzkum a jeho hypotézy v oblasti neustálého tlaku kritiky a nenechají tak výzkumníky upadnout do bezmezné víry v získaná data.

Kromě otázky úpravy vzorku pro pozorování je stejně podstatná také otázka úpravy výsledného obrazu. Se zvyšujícími se možnostmi počítačové grafiky je problematika zpracování, interpretace a publikování obrazových dat stále aktuálnější. Obraz je již nejen podpůrnou ilustrací doplňující předkládanou hypotézu, nýbrž přímo zkoumaným souborem dat. Obrázek s vysokým rozlišením je nejčastějším způsobem užití analýzy sebraných dat (Samuel 2013).

Rovněž to, že získáváme obraz nejrůznějšími neoptickými metodami a ten poté analyzujeme metodami pro zkoumání obrazu, by mohlo mít vliv na výsledky. Mějme na paměti, že ten obraz byl třeba získán tak, jako by se sbírala data ze slepecké hole a uznejme, že je to jen jedna možnost vnímání a následného zobrazení reality.

Pokud mluvíme o současných mikroskopických technikách, nemůžeme již mluvit čistě o „dívání se“ na zkoumané objekty, jelikož dnešní metody používají krom zraku rovněž de facto sluch a hmat či odrazy jiných než světlo nesoucích částic a až následně tyto vjemy převádějí do podoby obrazu, jenž je okem pozorovatelný a coby obraz dále zpracovatelný a zkoumatelný. Hacking tvrdí, že když se díváme na samotný obraz ze světelného mikroskopu, nemůžeme říci, že vidíme pozorovaný objekt, vidíme pouze jeho projekci. Připouští však, že pokud je nositelem obrazu světlo, které je pravděpodobně totéž, jako to, jímž k nám přicházejí optické vjemy z běžného světa kolem nás (ačkoliv namísto odrazu pozorovaným objektem prochází), pak si můžeme dovolit hovořit o stejnosti (*sameness*) projekce s pozorovaným objektem. To však razantně odmítá v případě metod, kde nefiguruje viditelné světlo jako nositel informace. Rentgenové paprsky ani elektrony nevidíme, neumíme pozorovat ani některé vlnové délky světla a tudíž nemůžeme mluvit o stejnosti (Hacking, 1983, str. 186-209).

Serpente buněčnou biologii dělí podle způsobu zobrazení studovaného objektu na dva směry: první buněčný- cytologický, využívající obrazu světelného mikroskopu a druhý směr označuje názvem molekulární, který využívá zobrazování pomocí modelů molekul, počítačových simulací a nebo obrázků, jenž znázorňují stopy zanechané molekulami v přístrojích nevizuálního charakteru. První směr byl zásadní pro formulování buněčné teorie.

V osmdesátých letech dvacátého století potom přistupuje ve velké míře molekulární směr, jenž doplňuje informace z cytologického směru o údaje týkající se funkce organel, zkoumání DNA či komunikace v buňce. Od té doby se nedá o těchto dvou směrech hovořit odděleně.

Výhody nové technologie bylo často důležité podpořit srovnáním s předchozí metodou, na jejíž způsob zobrazení již byli výzkumníci zvyklí. Již Hook v *Micrographii* předkládá vedle obrázku vzorku z pod mikroskopu také obrázek, jak je vzorek možno vidět pouhým okem. Pro uznání elektronové mikroskopie bylo v polovině čtyřicátých let třeba postavit obrázek z elektronového mikroskopu vedle obrázku téže buňky z mikroskopu světelného. (Serpente, 2011, str. 406). Podobný postup můžeme pozorovat ale i v pozdější době, kdy již zažitý obrázek z elektronového mikroskopu je v článku vedle obrázku z relativně nově využívaného akustického mikroskopu (viz obr. 8), Pro uznání nové metody je tedy třeba poukázat na její

návaznost na předchozí a zároveň se metody často doplňují a utvářejí tak komplexnější informaci o vzorku. Obdobné srovnání dvou snímků můžeme vidět v obrázku 5, kde je srovnání fluorescenční mikroskopie a konfokální účelem propagace konfokálního mikroskopu v komerční sféře.

Vžilo se též využití schématické ilustrace vedle elektronmikroskopického snímku pro objasnění čtenáři, jak interpretovat obraz (viz obr. 10). Podložení obrazem upevňuje pozici molekulární biologie.

Bez počítačového zpracování obrazu získaného jakýmkoliv z pozorování se dnes již neobejdeme, ať už to metoda pozorování přímo vyžaduje či chceme, byť světelným mikroskopem, získaný obrázek publikovat. Obrázky musí být jednoznačné, a tudíž se odstraňuje šum, zvyšuje intenzita kýžených objektů, upravuje světlost a nejružnější další úpravy se obrázku nevyhnou. To zda se ještě jedná o úpravy, které jsou chápány coby neškodné a nebo už se jedná o manipulaci s daty je dáno tím, zda jsou metody úprav považovány za korektní a objektivní. Council of Science Editors uvádí pravidla pro úpravu obrazu do vědeckých publikací (<http://www.councilscienceeditors.org/resource-library/editorial-policies/white-paper-on-publication-ethics/3-4-digital-images-and-misconduct/>, 18. 8. 2016), nicméně formulace „Úpravy jasu, kontrastu a vyvážení barev jsou přijatelné, pokud jsou aplikovány na celý obrázek a pokud nezasahují, nevypustí nebo nezkrasí žádnou informaci přítomnou v originále.“ Jenže přesně to dané úpravy dělají, každou touto úpravou se informace mění, i když třeba jen ty nepodstatné.

Podle Daston a Galison se v devatenáctém století prosazuje především snaha o naprosto věrné zobrazení tzv. „mechanická objektivita“- ta zahrnuje jakékoliv vkládání vlastních intencí do obrazu. Například Santiago Ramón y Cajal (1852- 1934), významný histolog, označil již ve své době záměrnou estetizaci vědeckých obrázků za jeden z největších zločinů proti správnému zobrazování. (Daston, 2007, str. 405- 412)

Dnes však obraz již nepodléhá tak striktním pravidlům, vylepšování je, jak je výše patrné, povoleno a rovněž se zohledňuje estetická stránka (Daston, 2007, str. 412). Pro oči čtenáře článku se připravuje senzační podívaná plná přelomových a jednoznačných uskupení. Ale zpravidla se jedná o nejvyvedenější obraz z celého výzkumu kde je všechno ideálně vidět. Je to logické, když si dá výzkumník tolik práce s úpravami obrázku (Cromey, 2010), že zvolí ten nejoptimálnější- ano umělec také nevystavuje nezdařilá díla, ale tohle nemá být umění, tohle je věda. Proto i zde je nutno stanovit alespoň nějaké hranice, jak to učinila například Marie

Farge, jež odsoudila nedbalost, se kterou je ve výzkumu subjektivně využíváno barev a simulací. Připomíná vliv simultánního barevného kontrastu⁶, který může produkovat nezamýšlenou informaci. Proti vlivu tohoto efektu navrhla software vkládající šedou mezi sousedící barevné oblasti. Vnímání odstínů červené a oranžové, coby teplých a modré a zelené coby chladných, je obecně známé, ale neměli bychom na něj zapomínat ani v případě obrazu ve vědě. Ittenův kontrast⁷ využívaný hlavně umělci může u pozorovatele vyvolat větší zájem o daný obraz či konkrétní část obrazu. Farge volá po sjednocení užívaných barev ve vědecké literatuře. (Daston, 2007, str. 405- 406)

Umění a věda však krácejí ruku v ruce již mnoho staletí, Leonardo da Vinci je zářným příkladem. Čtenáři sice o tomto pravidle zveřejňování nejkrásnějšího a upraveného obrazu vědí, nicméně nebylo by na škodu, kdyby bylo možné se také podívat na typický obraz z daného výzkumu. Kde se sice zkoumaný fenomén projevuje, ale jedná se o běžný obraz bez úprav.

⁶ Způsobuje opticky ohraničení menších objektů komplementární barvou, nebo jiný odstín v závislosti na barvě a sytosti pozadí.

⁷ Soubor kontrastů, jež upoutávají pozornost a je tedy možné jimi ozvláštnit umělecké dílo např.: světlý/tmavý, hojný/výjimečný či studený/teplý.

Závěr

Je dobře, že zkoumáme svět okolo nás novými metodami, ač ne vždy jsou ideální, jelikož jdeme-li dál v pozorování a na chyby přicházíme, jsme připraveni na to, že naše metody nemusí být bezchybné a měli bychom tedy být v přijímání a interpretacích našich výsledků pokorní. Taktéž je následně třeba uvážene volit úpravy získaného obrazu. Je ale na místě kombinovat metody pozorování tak, abychom co nejvíce omezili možnost pochybení v důsledku použití jedné nedokonalé pozorovací metody. Bez nových metod by se však naše poznávání zastavilo v mrtvém bodě.

Příště nehleďte na obrázek v článku jako na samozřejmost. Nejen, že se za ním skrývá mnoho práce autorů článku, ale i několikasetletý vývoj mikroskopických metod, bez nichž bychom dnes neměli poznání okolního světa na takové úrovni, na níž se nachází.

Zdroje

Literární zdroje

Alonso, J. L., & Goldmann, W. H. (2003). Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life sciences*, 72(23), 2553-2560.

Arias, I. M., Doyle, D., & Schimke, R. T. (1969). Studies on the synthesis and degradation of proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 244(12), 3303-3315.

Bentivoglio, M. (1998b). 1898: The Golgi apparatus emerges from nerve cells. *Trends in neurosciences*, 21(5), 195-200.

Bentivoglio, M. (1999). The discovery of the Golgi apparatus. *Journal of the History of the Neurosciences*, 8(2), 202-208.

Bentivoglio, M., & Mazzarello, P. (1998a). The pathway to the cell and its organelles: one hundred years of the Golgi apparatus. *Endeavour*, 22(3), 101-105.

Bernas, T., Zarębski, M., Cook, R. R., & Dobrucki, J. W. (2004). Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: role of anoxia and photon flux. *Journal of microscopy*, 215(3), 281-296.

Binnig, G., & Rohrer, H. (1983). Scanning tunneling microscopy. *Surface science*, 126(1-3), 236-244.

Binnig, G., Gerber, C., Stoll, E., Albrecht, T. R., & Quate, C. F. (1987). Atomic resolution with atomic force microscope. *EPL (Europhysics Letters)*, 3(12), 1281.

Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical review letters*, 56(9), 930..

Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., & Weibel, E. (1982a). Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical review letters*, 49(1), 57.

Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., & Weibel, E. (1982b). Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters*, 40(2), 178-180.

- Bozzola, J. J., & Russell, L. D. (1999). Electron microscopy: principles and techniques for biologists. *Jones & Bartlett Learning*.
- Branton, D. (1966). Fracture faces of frozen membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(5), 1048-1056.
- Claude, A., & Fullam, E. F. (1945). An electron microscope study of isolated mitochondria: method and preliminary results. *The Journal of experimental medicine*, 81(1), 51.
- Cromey, D. W. (2010). Avoiding twisted pixels: ethical guidelines for the appropriate use and manipulation of scientific digital images. *Science and engineering ethics*, 16(4), 639-667.
- Dallner, G., Siekevitz, P., & Palade, G. E. (1966). Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes I. Structural and chemical differentiation in developing rat hepatocyte. *The Journal of cell biology*, 30(1), 73-96.
- Dalton, A. J. (1951). Observations of the Golgi substance with the electron microscope. *Nature*
- Dalton, A. J., & Felix, M. D. (1954). Cytologic and cytochemical characteristics of the Golgi substance of epithelial cells of the epididymis—in situ, in homogenates and after isolation. *American Journal of Anatomy*, 94(2), 171-207.
- Daston, L. (2007). Objectivity. *Zone books*, Brooklyn, ISBN 978-1-890951-78-8
- Dröscher, A. (2011). Cellular dimensions and cell dynamics, or the difficulty over capturing time and space in the era of electron microscopy. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 42(4), 395-402.
- Dunn, F., & Fry, W. J. (1959). Ultrasonic absorption microscope. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 31(5), 632-633.
- Egner, A., Jakobs, S., & Hell, S. W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3370-3375.
- Erwin, S. C. (2016). Scanning probe microscopy: A picture worth a thousand bytes. *Nature Nanotechnology*.

- Földes-Papp, Z., Demel, U., & Tilz, G. P. (2003). Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. *International immunopharmacology*, 3(13), 1715-1729.
- Freudiger, C. W., Min, W., Saar, B. G., Lu, S., Holtom, G. R., He, C. & Xie, X. S. (2008). Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science*, 322(5909), 1857-1861.
- Granick, S., & Porter, K. R. (1947). The structure of the spinach chloroplast as interpreted with the electron microscope. *American Journal of Botany*, 545-550.
- Hacking, I. (1983). Representing and intervening: Introductory topics in the philosophy of natural science. *Cambridge University Press*. ISBN-13: 978-0521282468
- Haguenau, F., Hawkes, P. W., Hutchison, J. L., Satiat-Jeunemaître, B., Simon, G. T., & Williams, D. B. (2003). Key events in the history of electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 9(02), 96-138.
- Hand, R. (1978). Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell*, 15(2), 317-325.
- Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria?. *Journal of the American Geriatrics Society*, 20(4), 145-147.
- Heinz, W. F., & Hoh, J. H. (1999). Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends in biotechnology*, 17(4), 143-150.
- Herrmann, P., Steinhauser, K. A., Gähler, R., Steyerl, A. A., & Mampe, W. (1985). Neutron microscope. *Physical review letters*, 54(18), 1969.
- Hillman, H., & Sartory, P. (1977). The unit membrane, the endoplasmic reticulum, and the nuclear pores are artefacts. *Perception*, 6(6), 667-673.
- Chen, C. J. (1993). Introduction to scanning tunneling microscopy (Vol. 2). New York. *Oxford University Press*.
- Jamieson, J. D., & Palade, G. E. (1967). Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. *The Journal of Cell Biology*, 34(2), 577-596.
- Ji, N., Magee, J. C., & Betzig, E. (2008). High-speed, low-photodamage nonlinear imaging using passive pulse splitters. *Nature methods*, 5(2), 197-202.

- Johnson, L. V., Walsh, M. L., & Chen, L. B. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(2), 990-994.
- Johnston, R. N., Atalar, A., Heiserman, J., Jipson, V., & Quate, C. F. (1979). Acoustic microscopy: resolution of subcellular detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(7), 3325-3329.
- Karbowski, M., & Youle, R. J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 10(8), 870-880.
- Kirz, J., & Jacobsen, C. (2009). The history and future of x-ray microscopy. *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 186, No. 1, p. 012001). IOP Publishing.
- Kolodner, R., & Tewari, K. K. (1975). The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 402(3), 372-390.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer Science+Business Media*, New York, ISBN-13: 978-0387-31278-1
- Lancaster, C. (2014). A focus on the history of light microscopy for cell culture. *Kaleidoscope*, 6(1), 27-47.
- Lemons, R. A., & Quate, C. F. (1975). Acoustic microscopy: biomedical applications. *Science*, 188(4191), 905-911.
- Leyon, H. (1954). The structure of chloroplasts: IV. The development and structure of the *Aspidistra* chloroplast. *Experimental cell research*, 7(1), 265-273.
- Matsumoto, B. (2003). Cell biological applications of confocal microscopy (Vol. 70). *Academic Press*.
- Mazzarello, P. (1999). A unifying concept: the history of cell theory. *Nature Cell Biology*, 1(1), E13-E15.
- Meidner, H. (1985). Historical Sketches 12. *Journal of Experimental Botany*, 36(12), 1996-1997.
- Murphy, D. B., & Davidson, M. W. (2013). Fundamentals of Light Microscopy. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Second Edition, 1-19.

- Palade, G. E. (1952a). A study of fixation for electron microscopy. *The Journal of experimental medicine*, 95(3), 285-298.
- Palade, G. E. (1952b). The fine structure of mitochondria. *The Anatomical Record*, 114(3), 427-451.
- Palade, G. E., & Claude, A. (1949). The nature of the Golgi apparatus. I. Parallelism between intercellular myelin figures and Golgi apparatus in somatic cells. *Journal of morphology*, 85(1), 35-69.
- Plášek, J. (1995). Konfokální mikroskop. *Renezance experimentálních metod, Vesmír*, 74, 9.
- Porter, K. R., Claude, A., & Fullam, E. F. (1945). A study of tissue culture cells by electron microscopy methods and preliminary observations. *The Journal of experimental medicine*, 81(3), 233-246.
- Ris, H., & Plaut, W. (1962). Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of Chlamydomonas. *The Journal of cell biology*, 13(3), 383-391.
- Sabatini, D. D., Bensch, K., & Barnett, R. J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *The Journal of cell biology*, 17(1), 19-58.
- Samuel, N. (2013). Images as tools. On visual epistemic practices in the biological sciences. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 44(2), 225-236.
- Serpente, N. (2011). Cells from icons to symbols: Molecularizing cell biology in the 1980s. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 42(4), 403-411.
- Shan, Y., & Wang, H. (2015). The structure and function of cell membranes examined by atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 44(11), 3617-3638.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., ... & Ohto, C. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *The EMBO journal*, 5(9), 2043.

- Shotton, D., & Shotton, D. (1993). Electronic light microscopy: the principles and practice of video-enhanced contrast, digital intensified fluorescence, and confocal scanning light microscopy. *Wiley-Liss*, ISBN 0-471-56077-4
- Schwartz, R. M., & Dayhoff, M. O. (1978). Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science*, vol. 199, 395-403
- Singer, C. (1914). Notes on the early history of microscopy. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 7(Sect Hist Med), 247.
- Singer, C. (1915). The dawn of microscopical discovery. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 35(4), 317-340.
- Tamayo, J., & Garcia, R. (1996). Deformation, contact time, and phase contrast in tapping mode scanning force microscopy. *Langmuir*, 12(18), 4430-4435.
- Vogelstein, B., Pardoll, D. M., & Coffey, D. S. (1980). Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell*, 22(1), 79-85.
- Walsh, M. A. (1989). *Biology*. Fifth Edition. Worth Publishers. ISBN 0-87901-394-X
- Ward, B. W., Notte, J. A., & Economou, N. P. (2006). Helium ion microscope: A new tool for nanoscale microscopy and metrology. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 24(6), 2871-2874.
- Wikstrom, M. K. (1977). Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature*, 266(5599), 271-273.
- Wilson, C. (1995). *The invisible world: early modern philosophy and the invention of the microscope* (Vol. 228). Princeton.
- Wolken, J. J., & Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of two flagellates. Chloroplast structure and variation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 56(5), 873-889.
- Wyckoff, R. W. (1946). Frozen-dried preparations for the electron microscope. *Science*, 104(2689), 36-37.

Internetové zdroje

<http://media.web.britannica.com/eb-media/10/109410-004-B2D57355.jpg> (28. 7. 2016)

<https://www.flickr.com/photos/107387387@N06/10618754893/> (28. 7. 2016)

<http://researcher.watson.ibm.com/researcher/files/us-flinte/stm10.jpg> 16. 8. 2016

http://seedmagazine.com/portfolio/22_library-of-lungs.html (28. 7. 2016)

http://uacc.arizona.edu/sites/default/files/confocal_comparison.png (4.8.2016)

<http://web.physics.ucsb.edu/~hhansma/Image0016-afm.jpg> (26.5.2016)

<http://www.councilscienceeditors.org/resource-library/editorial-policies/white-paper-on-publication-ethics/3-4-digital-images-and-misconduct/> (18. 8. 2016)

<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/imgaug08/A7.jpg> (17. 8. 2016)

http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/multiple-ion-beam/orion-nanofab-for-materials.html, 15. 8. 2016

http://www1.udel.edu/udaily/2012/oct/images/3D_yeast_cell_FIB.jpg 16.8.2016

https://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope#/media/File:Misc_pollen.jpg (28. 7. 2016)

https://microscopy.stanford.edu/sites/default/files/fly_brain_1200x_small.png (14. 8. 2016)

https://www.fei.com/uploadedImages/FEISite/Content/Image_Gallery/Images/IM_20100301_Hagen_4_Lilium_Pollen_lg.jpg (28. 7. 2016)

<https://www.prirodovedci.cz/storage/images/410x/4415.jpg> (28. 7. 2016)

NEBESÁŘOVÁ, Jana. [online]. (20. 7. 2016). Dostupné z:

<http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/4.2.html>